

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



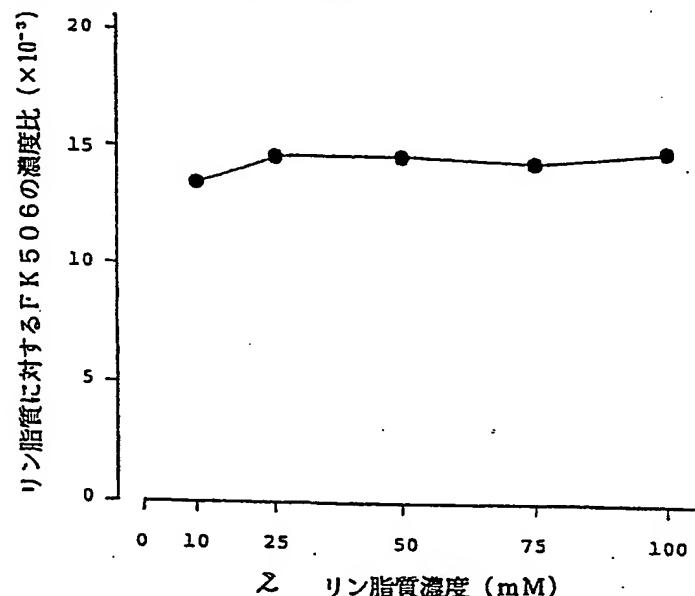
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 31/40, 31/445, 31/55 A61K 9/127	A1	(11) 国際公開番号 (43) 国際公開日 WO 93/08802 1993年5月13日 (13.05.1993)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/01388 (22) 国際出願日 1992年10月26日 (26. 10. 92) (30) 優先権データ 特願平3/313422 1991年10月31日 (31. 10. 91) JP		(74) 代理人 弁理士 植木久一 (UEKI, Kyuichi) 〒530 大阪府大阪市北区堂島2丁目3番7号 シンコービル407 植木特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 加賀山彰 (KAGAYAMA, Akira) [JP/JP] 〒630-001 奈良県生駒市真弓南1丁目13-7 Nara, (JP) 徳永雄二 (TOKUNAGA, Yuji) [JP/JP] 〒669-13 兵庫県三田市あかしあ台3丁目5-6 Hyogo, (JP) 貝原徳紀 (KAIBARA, Atsunori) [JP/JP] 〒569 大阪府高槻市寺谷町10-24 Osaka, (JP) 谷本幸代 (TANIMOTO, Sachiko) [JP/JP] 〒571 大阪府門真市栄町7-7 コーポラス都I-206号 Osaka, (JP) 堺 武久 (HATA, Takehisa) [JP/JP] 〒617 京都府長岡京市河陽ヶ丘2-4-2 Kyoto, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : LIPOSOME PREPARATION CONTAINING TRICYCLIC COMPOUND

(54) 発明の名称 トリクロ化合物含有リポソーム製剤

1 ... Concn. ratio of FK506 to phospholipid ($\times 10^{-3}$)
2 ... Phospholipid concn. (mM)



(57) Abstract

A liposome preparation containing, incorporated in liposome, an immunosuppressive tricyclic compound or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Since the tricyclic compound is incorporated in liposome stably and quantitatively, a pharmaceutical preparation with an excellent persistence of drug efficacy can be provided in a wide variety of preparation forms.

(57) 要約

免疫抑制作用を有するトリシクロ化合物または医薬として許容されるその塩をリボソーム中に含有させたトリシクロ化合物含有リボソーム製剤である。トリシクロ化合物がリボソーム中へ安定かつ定量的に取り込まれているので広範な薬剤形態をとることができ、薬効の持続性に優れた製剤を提供することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	FR フランス	MW マラウイ
AU オーストラリア	GA ガボン	NL オランダ
BB バルバードス	GB イギリス	NO ノルウェー
BE ベルギー	GN ギニア	NZ ニュージーランド
BF ブルキナ・ファソ	GR ギリシャ	PL ポーランド
BG ブルガリア	HU ハンガリー	PT ポルトガル
BJ ベナン	IE アイルランド	RO ルーマニア
BR ブラジル	IT イタリー	RU ロシア連邦
CA カナダ	JP 日本	SD スーダン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CG コンゴ	KR 大韓民国	SK スロヴァキア共和国
CH スイス	KZ カザフスタン	SN セネガル
CI コート・ジボアール	LJ リヒテンシュタイン	SU ソヴィエト連邦
CM カメルーン	LK スリランカ	TD チャード
CS チェコスロバキア	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
CZ チェコ共和国	MG モナコ	UA ウクライナ
DE ドイツ	MG マダガスカル	US 米国
DK デンマーク	ML マリ	VN ベトナム
FI フィンランド	MN モンゴル	
ES スペイン	MR モーリタニア	

1

明細書

発明の名称

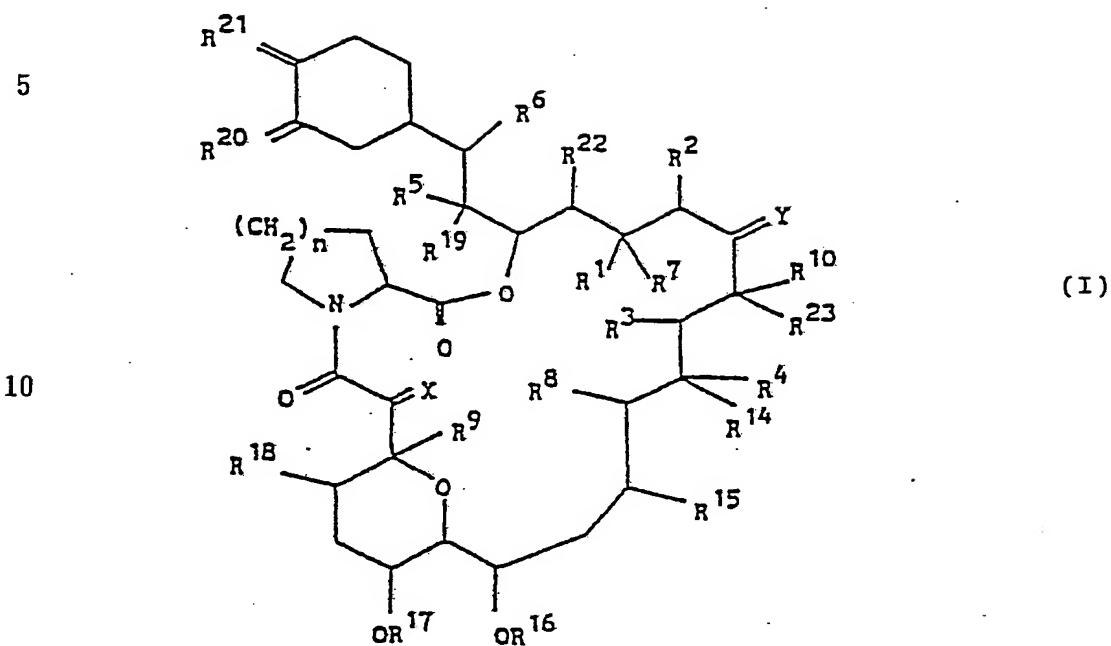
トリシクロ化合物含有リポソーム製剤

技術分野

この発明は優れた免疫抑制作用を有するということで注目されている後記一般式（I）で示されるトリシクロ化合物または医薬として許容されるその塩を有効成分として含有するリポソーム製剤に関するものであり、詳細には上記有効成分をリポソーム中に安定に取り込むことによって、生理食塩液、ブドウ糖注射液、水、ジュース等の媒体中でも安定した溶液状態を維持し、従って注射、例えば静脈注射、筋肉注射、関節内等への局所注射、更には皮膚への塗布、点眼、点鼻、吸入等の局所投与、また更には経口投与、直腸注入を始めとする種々の投与形態に適合することのできるリポソーム製剤に関するものである。

1 背景技術

一般式 (I)



15

(式中、R¹ および R²、R³ および R⁴、R⁵ および R⁶ の隣接するそれぞれの対は、各々独立して、

a) 2つの隣接する水素原子を表わすか、もしくは

b) 結合している炭素原子との間でもうひとつの結合を形成してもよく、

それに加え、R² はアルキル基であってもよく、

R⁷ は水素原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、もしくはアルキルオキシ基を表わすか、または R¹ と共になってオキソ基を表わしていてもよく、

25 R⁸ および R⁹ は独立して、水素原子、ヒドロキシ基を、

1 R¹⁰は水素原子、アルキル基、1以上のヒドロキシ基によって置換されたアルキル基、アルケニル基、1以上のヒドロキシ基によって置換されたアルケニル基、またはオキソ基によって置換されたアルキル基を、

5 Xはオキソ基、(水素原子、ヒドロキシ基)、(水素原子、水素原子)、または式-C H₂-O-で表わされる基を、Yはオキソ基、(水素原子、ヒドロキシ基)、(水素原子、水素原子)、または式=N-N R¹¹R¹²もしくは=N-O R¹³で表わされる基を、

10 R¹¹およびR¹²は独立して水素原子、アルキル基、アリール基またはトシリル基を、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶、R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹、R²²およびR²³は独立して水素原子またはアルキル基を、R²⁰およびR²¹は、独立してオキソ基、または各々独立して(R²⁰a、水素原子)および(R²¹a、水素原子)であってもよく、R²⁰aおよびR²¹aは独立してヒドロキシ基、アルキルオキシ基、もしくは、式-O C H₂-O C H₂C H₂-O C H₃で表わされる基、またはR²¹aは保護されたヒドロキシ基を表わし、さらにR²⁰aおよびR²¹aは共になってエポキシド環中の酸素原子を表わしていてもよく、

nは1、2または3を表わす。

上記の意味に加え、さらにY、R¹⁰およびR²³はそれらが結合している炭素原子と一緒にになって飽和もしくは不飽和の5員もしくは6員環からなる窒素原子、硫黄原子および/も

4.

1 しくは酸素原子を含有する複素環基を表わしていてもよい
が、その複素環基は、アルキル基、ヒドロキシ基、1以上の
ヒドロキシ基によって置換されたアルキル基、アルキルオキ
シ基、ベンジル基および式 - C₆H₅Se (C₆H₅) で表わ
5 される基から選ばれる1以上の基によって置換されていても
よい) で示される化合物または医薬として許容されるその塩
は、免疫抑制作用を有する物質として公知であり（特開昭61
- 148181号公報、ヨーロッパ特許公開第0323042号参照）、
心臓、肝臓、腎臓、骨髓、皮膚、角膜、肺臓、脾臓、小腸、
10 神経、四肢等の臓器移植を始めとする各医療分野における利
用が期待されている。

上記化合物(I)とその医薬的に許容される塩は、上記の
2つの特許公報に開示されたものと同一の方法で得られる。
特に、ストレプトミセス・ツクバエンシス No. 9993 (微工研
15 寄第927号) かまたはストレプトミセス・ハイグロスコピ
カス・サブスペーシス・ヤクシマエンシス No. 7238 (微工研
寄第928号) の培養によって製造されたマクロライド類
は、FR-900506, FR-900520, FR-900523, FR-900525 と番号がつ
けられている。

20 化合物(I)または医薬として許容されるその塩 [以下
「化合物(I)」の表現で代表する] は難水溶性であり、従
ってこれを液状医薬として利用するに当たっては、汎用され
ている水溶性の可溶化剤 (エタノール、ポリエチレングリコ
ール、界面活性剤等) を用いて可溶化させることが考えられ
25 る。

1 しかし上記手段で調製された液剤は、投与部位において体
液で希釈されたときに結晶の析出を生じることがあり、この
場合はバイオアベイラビリティが低下するという問題があ
る。その他の問題としては、生体内に投与された後の挙動状
5 態、例えば特に高濃度に移行してほしい組織に対する集中的
な組織移行性の如何、移行することを望まない部位に必要以
上の薬物が移行することによる副作用の問題、さらには薬効
の持続性の問題、局所投与における有効成分の組織移行性な
ど、未解決の問題が多く残されている。

10 発明の開示

この発明は、体液に接しても結晶の析出を生じることのな
い安定な液剤として、また上記の様な種々の課題に対して治
療上の優れた効果を発揮することが期待される液剤として、
上記トリシクロ化合物（I）からなる活性成分が、種々の形
15 態からなるリボソーム中に取り込まれたトリシクロ化合物
(I) 含有リボソーム製剤について開示するものである。

図面の簡単な説明

リボソーム中に取り込まれたFK506の濃度を示すグラ
フである。

20 発明を実施するための最良の形態

まず一般式（I）において使用されている各定義及びその
具体例、並びにその好ましい実施態様を以下詳細に説明す
る。

「低級」とは特に指示がなければ、炭素原子1～6個を有
25 する基を意味するものとする。

1 「アルキル基」の好ましい例としては、直鎖もしくは分枝
鎖脂肪族炭化水素残基が挙げられ、たとえばメチル、エチ
ル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ベンチ
ル、ネオベンチル、ヘキシル等の低級アルキル基が挙げられ
る。

5 「アルケニル基」の好ましい例としては、1個の二重結合
を含有する直鎖もしくは分枝鎖脂肪族炭化水素残基が挙げら
れ、たとえばビニル、プロペニル、ブテニル、メチルプロペ
ニル、ベンテニル、ヘキセニル等の低級アルケニル基が挙げ
10 られる。

「アリール基」の好ましい例としては、フェニル、トリ
ル、キシリル、クメニル、メシチル、ナフチル等が挙げられ
る。

15 「保護されたヒドロキシ基」における好適な保護基として
は、例えばメチルチオメチル、エチルチオメチル、プロピル
チオメチル、イソプロピルチオメチル、ブチルチオメチル、
イソブチルチオメチル、ヘキシルチオメチル等の低級アルキ
ルチオメチル基のような1-(低級アルキルチオ)(低級)
アルキル基、さらに好ましいものとしてC₁~C₄アルキル
20 チオメチル基、最も好ましいものとしてメチルチオメチル
基;

25 例えばトリメチルシリル、トリエチルシリル、トリブチル
シリル、第三級ブチルージメチルシリル、トリ第三級ブチル
シリル等のトリ(低級)アルキルシリル、例えばメチルージ
フェニルシリル、エチルージフェニルシリル、プロピルージ

1 フェニルシリル、第三級ブチルージフェニルシリル等の低級
アルキルージアリールシリル等のようなトリ置換シリル基、
さらに好ましいものとしてトリ(C₁ ~ C₄)アルキルシリル基およびC₁ ~ C₄アルキルジフェニルシリル基、最も好
5 ましいものとして第三級ブチルージメチルシリル基および第
三級ブチルージフェニルシリル基；

カルボン酸、スルホン酸およびカルバミン酸から誘導される脂肪族アシル基、芳香族アシル基および芳香族基で置換された脂肪族アシル基のようなアシル基；等が挙げられる。

10 脂肪族アシル基としては、例えばホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ピバロイル、ヘキサノイル、カルボキシアセチル、カルボキシプロピオニル、カルボキシブチリル、カルボキシヘキサノイル等の、カルボキシのような適当な置換基を1個以上有していてもよい低級アルカノイル基、例えばシクロプロピルオキシアセチル、シクロブチルオキシプロピオニル、シクロヘプチルオキシブチリル、メンチルオキシアセチル、メンチルオキシプロピオニル、メンチルオキシブチリル、メンチルオキシペンタノイル、メンチルオキシヘキサノイル等
15 の、低級アルキルのような適当な置換基を1個以上有していてもよいシクロ(低級)アルコキシ(低級)アルカノイル基、カンファースルホニル基、例えばカルボキシメチルカルバモイル、カルボキシエチルカルバモイル、カルボキシプロピルカルバモイル、カルボキシブチルカルバモイル、カルボ
20 キシペンチルカルバモイル、カルボキシヘキシルカルバモイ
25 キシベンチルカルバモイル、カルボキシヘキシルカルバモイ

I ル等のカルボキシ(低級)アルキルカルバモイル基、または
例えばトリメチルシリルメチキシカルボニルエチルカルバモ
イル、トリメチルシリルエトキシカルボニルプロピルカルバ
モイル、トリエチルシリルエトキシカルボニルプロピルカル
バモイル、第三級ブチルジメチルシリルエトキシカルボニル
プロピルカルバモイル、トリメチルシリルプロボキシカルボ
ニルブチルカルバモイル基等のトリ(低級)アルキルシリル
(低級)アルコキシカルボニル(低級)アルキルカルバモイ
ル基等の保護されたカルボキシ(低級)アルキルカルバモイ
ル基等のようなカルボキシもしくは保護されたカルボキシの
ような適当な置換基を1個以上有する低級アルキルカルバモ
イル基等が挙げられる。

芳香族アシル基としては、例えばベンゾイル、トルオイル、
キシロイル、ナフトイル、ニトロベンゾイル、ジニトロ
ベンゾイル、ニトロナフトイル等の、ニトロのような適当な
置換基を1個以上有してもよいアロイル基、例えばベンゼン
スルホニル、トルエンスルホニル、キシレンスルホニル、ナ
フタレンスルホニル、フルオロベンゼンスルホニル、クロロ
ベンゼンスルホニル、プロモベンゼンスルホニル、ヨードベ
ンゼンスルホニル等の、ハロゲンのような適当な置換基を1
個以上有していてもよいアレーンスルホニル基等が挙げられ
る。

芳香族基で置換された脂肪族アシル基としては、例えば、
フェニルアセチル、フェニルプロピオニル、フェニルブチリ
ル、2-トリフルオロメチル-2-メトキシ-2-フェニル

1 アセチル、2-エチル-2-トリフルオロメチル-2-フェニルアセチル、2-トリフルオロメチル-2-プロポキシ-2-フェニルアセチル等の、低級アルコキシおよびトリハロ(低級)アルキルのような適当な置換基を1個以上有している
 5 てもよいアル(低級)アルカノイル基等が挙げられる。

上記アシル基中、さらに好ましいアシル基としては、カルボキシを有してもよいC₁～C₄アルカノイル基、シクロアルキル部分に(C₁～C₄)アルキルを2個有するシクロ(C₅～C₆)アルキルオキシ(C₁～C₄)アルカノイル基、カンファースルホニル基、カルボキシ(C₁～C₄)アルキルカルバモイル基、トリ(C₁～C₄)アルキルシリル(C₁～C₄)アルコキシカルボニル(C₁～C₄)アルキルカルバモイル基、ニトロ基を1個または2個有していてもよいベンゾイル基、ハロゲンを有するベンゼンスルホニル基、C₁～C₄アルコキシとトリハロ(C₁～C₄)アルキルを有するフェニル(C₁～C₄)アルカノイル基が挙げられ、それらのうち、最も好ましいものとしては、アセチル、カルボキシプロピオニル、メンチルオキシアセチル、カンファースルホニル、ベンゾイル、ニトロベンゾイル、ジニトロベンゾイル、ヨードベンゼンスルホニルおよび2-トリフルオロメチル-2-メトキシ-2-フェニルアセチルが挙げられる。

「5員もしくは6員環からなる窒素原子、硫黄原子および／もしくは酸素原子を含有する複素環基」の好ましい例としては、ピロリル基、テトラヒドロフリル基等が挙げられる。

1 化合物（I）の医薬として許容される塩としては、無毒の、医薬として許容される慣用の塩であり、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、例えばトリエチルアミン塩、N-ベンジル-N-メチルアミン塩等のアミン塩のような無機または有機塩基との塩が挙げられる。

化合物（I）において、コンホーマーあるいは不斉炭素原子および二重結合に起因する光学異性体および幾何異性体の10ような1対以上の立体異性体が存在することがあり、そのようなコンホーマーあるいは異性体もこの発明の範囲に包含される。

次にこの発明で提供されるリポソーム製剤について説明する。

15 本発明に係るリポソーム製剤は上記したトリシクロ化合物（I）を含有することが必須条件であり、リポソーム自体の構造、構成成分、調製方法、大きさ、併用化合物等についてはトリシクロ化合物（I）を安定的に含有する上で障害となるない限り一切制限を受けない。従って例えばリポソームの構造体については、大きな一枚膜リポソーム（LUV）、多重層リポソーム（MLV）、小さな一枚膜リポソーム（SUV）のいずれであってもよい。従ってその大きさもLUVでは200～1000nm、MLVでは400～3500nm、SUVでは20～50nm程度の粒子径をとり得るが、これらの20中でもトリシクロ化合物（I）を安定的に含有する上でもつ

1 とも好ましいのは粒子径 200 ~ 1000 nm の M L V である。

次にリボソーム構造を形成する為の脂質については、リン脂質や窒素脂質が用いられるが、一般的にはリン脂質が好適であり、例えば卵黄レシチン（ホスファチジルコリン）、大豆レシチン、リゾレシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、カルジオリビン、プラズマローゲン等の天然リン脂質、あるいはこれらを常法によって水素添加したものその他、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン、エレオステアロイルホスファチジルセリン等の合成リン脂質が挙げられる。

これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることもできるが、2種以上を併用することも可能である。この場合レシチン類、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン等の様に、ホスファチジル基部分の陰性基と、これと結合する原子団（エタノールアミンやコリン等）における陽性基が分子内で電気的に中和し、全体として中性電荷を有するものは、単独で使用

1 することが多い。これに対しホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール等の様にホスファチジル基部分（陰性基）と結合する原子団がセリン、グリセロール、イノシトール等の様に中性である為全体
5 として負電荷を示すもの、或はその他ホスファチジン酸やジセチルホスフェート等の様な負電荷を示すもの等は、脂質として単独で使用することも可能であるが、どちらかと言えば前記した様な中性電荷を示すものと併用することが推奨される。尚これらのうちホスファチジン酸やジセチルホスフェート等はリボソーム形成時の主要リン脂質として作用するのではなく、一般にリボソーム形成用添加剤として知られ且つこの発明においても使用することが可能なコレステロール類、ステアリルアミン、 α -トコフェロール等と同じ様な添加剤と位置付けることもできる。また上記以外の使用可能な添加
10 剤としては、ボリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤、ガングリオシド、酸性糖脂質であるサルファトイドや硫酸基を有する糖脂質、ことにスルフィド糖で代表される様な負電荷を有する膜構成成分が用いられる場合もある。これらの添加剤はリボソーム含有製剤の形成を容易にするもの、リボソーム含有製剤を形成したときの該製剤中におけるリボソームの安定性を向上させるもの、臓器移行についての選択性を与えるもの、主薬であるトリシクロ化合物（I）のリボソームからの放出性を制御するもの等、夫々の目的を考慮して選択すべきである。
15
20
25 リボソームの調製法についても格別の制限を受けるもので

1 はないが、前記したリポソーム構造毎の推奨方法を掲記しておくと下記の通りである。

(イ) 大きな一枚膜リポソーム (LUV) :

エーテル注入法 [Deamer, D. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 308 5 250 (1978)]

界面活性剤法 [Brunner, J., et al: Biochim. Biophys. Acta, 455 322 (1976)]

同上 [kagawa, Y., et al: J. Biol. Chem., 246 5477 (1971)]

Ca²⁺融合法 [Papahadjopoulos, D., et al: Biochim. Biophys. Acta, 394 483 (1975)]

凍結 - 融解法 [Pick, U.: Arch. Biochim. Biophys., 212 186 (1981)]

逆相蒸発法 [Szoka, F., et al: Biochim. Biophys. Acta, 601 559 (1980)]

15 巨大一枚膜リポソームの形成 [Oku, N., et al: Biochim. Biophys. Acta, 692 384 (1982)]

(ロ) 多重層リポソーム (MLV)

Bangham 法 [Bangham, A. D., et al: J. Mol. Biol., 13 238 (1965)]

20 (ハ) 小さな一枚膜リポソーム (SUV)

超音波処理法 [Huang, C.: Biochemistry, 8 344 (1969)]

エタノール注入法 [Kremer, J. M. H., et al: Biochemistry, 16 3932 (1977)]

25 フレンチプレス法 [Barenholz, Y., et al: FEBS Lett., 99 210 (1979)]

1 上記掲記方法はいずれもリボソーム皮膜形成のための基本的手法を示すものであり、これらの方法を任意に組合わせたり、或は夫々に改良、発展を加えた方法を採用し得ることは言う迄もない。例えばリボソームを形成した後、紫外線或は
5 放射線等の活性電磁波による処理を施して、重合による膜強化を図る様な方法を採用することもできる。

本発明において採用される代表的なリボソーム形成法を例示的に説明しておくと、例えば上記した様なリボソーム形成物質を主薬やコレステロール等と共にクロロホルムやエタノール等の有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて減圧下に溶媒を留去して容器内面にリボソーム形成物質の膜を形成する。これに緩衝液を加えて攪拌し、得られた懸濁液から濾過或は遠心分離の様な常用の手段によってリボソームを単離する。この様にして得られるリボソームは、適当な溶媒中に懸濁させるか、或はいったん凍結乾燥したものを適当な溶媒中に再分散させて治療に用いられる。

この様にして得られるトリシクロ化合物（I）含有リボソーム製剤におけるトリシクロ化合物（I）の含有量は、適用部位に応じて種々設定することが望ましく、静注用としては
20 0.05～50mg/ml、筋注用としては1～50mg/ml、点眼剤としては0.1～50mg/ml、経口用としては0.1～50mg/mlとすることが推められる。尚これらは投与部位に応じて、水、生理食塩水、ブドウ糖注射液、ジュース、牛乳等の水性媒体で希釈することも可能であり、これによって上記した濃度以下に
25 なることは言うまでもない。

1 本発明のトリシクロ化合物含有リポソーム製剤は、以下に
開示された化合物を有効成分として含有させるときにも有効
に利用することができる。例えばEP-A-353678,特開平 2-743
30号,PCT/GB90/01262,EP-A-413532,PCT/JP91/00314,英國特
5 許No.9012963.6, 同No.9014136.7, 同No.9014681.2, 同No.9
014880.0, 同No.9014881.8, 同No.9015098.8, 同No.9016115
.9, 同No.9016693.5,EP-A-323865, 同349061, 同358508, 同
364031, 同364032, 同378317, 同378320, 同378321, 同3881
53, 同396399, 同396400, 同399579, 同403242, 同428365,
10 同356399,GB2225576.A,EP-A-402931, 同427680。

この発明によって提供されるトリシクロ化合物（I）含有
のリポソーム製剤は、図1に示す試験結果からも明らかである
様にトリシクロ化合物（I）がリポソーム中へほぼ定量的
に取り込まれている。図1に示す試験では、トリシクロ化
合物（I）として後述するFK506を用いた。即ち図1は、
前記したクロロホルムやエタノール等の溶媒中に形成したリ
ン脂質濃度（横軸）と、得られたりポソーム中に取り込まれ
たFK506の濃度（縦軸）の関係を示すものであり、FK
506の濃度が常に一定であることから、製剤化における含
15 有量制御が非常に精度よくなされ得ることが理解される。尚
FK506の濃度が常に一定であることから、製剤化における含
有量制御が非常に精度よくなされ得ることが理解される。尚
20 図1のデータからはリン脂質とFK506のモル比率が約1
000:15であり、この値を目安にしてリポソーム製造の
を行うことが推奨される。

実施例1

25 化合物（I）として

1 R¹、R²、R⁸、R²³=水素

R⁷、R⁹=ヒドロキシ基 R¹⁰=アリル基

R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶、R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹、R²²=メチル基

R²⁰=(R²⁰a、H) (R²⁰a=メトキシ基)

5 R²¹=(R²¹a、H) (R²¹a=ヒドロキシ基)

X、Y=オキソ基 n=2

R³、R⁴=結合している炭素原子との間のもう一つの結合

R⁵、R⁶=結合している炭素原子との間のもう一つの結合

として表わされる遊離状態の化合物を選んだ。この化合物
10 は特に優れた免疫抑制作用を有し、以下FK506と称す。

卵黄ホスファチジルコリン(3.05g)、コレステロール(1.16g)、ホスファチジルセリン(0.762g)
15)、FK506(82.2mg)を適当量のクロロホルム/メタノール混液(容量比=4/1)に溶解し、減圧乾固して容

器の内壁面に薄膜を形成する。これにリン酸緩衝生理食塩水
50mlを加え、ボルテックスミキサー(井内盛栄堂社製)による攪拌を加えた。得られた懸濁液を10mlと40mlに二分
した。

① 10ml採取した懸濁液を孔径3μm、次いで1μmの
20 ポリカーボネート膜で順次漣過を行い、リボソーム製剤を得
た。このリボソーム製剤中のFK506含量を、0.5mg/ml濃度となる様にリン酸緩衝生理食塩水で調製した。リボソ
ームの平均粒径は432nmであった。

② 40ml採取した懸濁液をナノマイザー(コスマ計装社
25 製)により4℃、7気圧下で10分間処理後、4℃×150

1 0 0 rpm × 60 分の条件で遠心分離した。得られた上澄み中の FK506 含量を 0.5 mg/ml 濃度となる様にリン酸緩衝生理食塩水で調製した。リポソームの平均粒子径は 30 nm 以下であった。

5 実施例 2

卵黄ホスファチジルコリン (7.62 g)、コレステロール (2.32 g)、FK506 (164.4 mg) を適当量のクロロホルム／メタノール混液 (容量比 = 4 / 1) に溶解し、減圧乾固して容器の内壁面に薄膜を形成する。これにリン酸緩衝生理食塩水 100 ml を加え、ボルテックスミキサー (井内盛栄堂社製) による攪拌を加え懸濁液を得た。

① その懸濁液 10 ml を孔径 3 μm、次いで 1 μm のポリカーボネート膜で順次濾過を行い、リポソーム製剤を得た。このリポソーム製剤中の FK506 含量を、0.5 mg/ml 濃度となる様にリン酸緩衝生理食塩水で調製した。リポソームの平均粒径は 58.7 nm であった。

② 上記の懸濁液 40 ml をナノマイザー (コスモ計装社製) により 4°C、7 気圧下で 30 分間処理後、4°C × 1500 rpm × 60 分の条件で遠心分離した。得られた上澄み中の FK506 含量を 0.5 mg/ml 濃度となる様にリン酸緩衝生理食塩水で調製した。リポソームの平均粒子径は 30 nm 以下であった。

実施例 3

卵黄ホスファチジルコリン (3.81 g) およびコレステロール (1.16 g) を適当量のクロロホルム／メタノール

- 1 混液（容量比 = 4 / 1）に溶解し、減圧乾固して容器の内壁面に薄膜を形成する。これにリン酸緩衝生理食塩水 50 ml を加え、ボルテックスミキサー（井内盛栄堂社製）による攪拌を加えた。
- 5 得られた懸濁液 50 ml をナノマイザー（コスモ計装社製）により 4 °C, 7 気圧下で 15 分間処理した後、4 °C × 15000 rpm × 60 分の条件で遠心分離した。得られた上澄み液を Millex GV (0.22 μm, ミリポア社製) にて濾過し、リボソーム懸濁液を得た。この懸濁液をリン酸緩衝生理食塩水により希釈し種々のリン脂質濃度を有するリボソーム懸濁液を得た。次にリボソーム懸濁液 10 ml に FK 506 の原末約 20 mg を添加し、攪拌しながら室温に放置した。原末添加後経時的に試験液をサンプリングし、10000 rpm × 1 分遠心分離後、上澄みを Millex GV で濾過した。濾液中の FK 506 濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて定量することにより、リボソームに取り込まれた FK 506 量を算出した。結果を図 1 に示す。
- 10
- 15

産業上の利用分野

この発明のリボソーム製剤は上記の様に構成されているので、水に対して難溶性であるトリシクロ化合物（I）を安定な溶液製剤とすることが可能であり、体液と接しても活性成分の結晶析出を生じることがないので、優れたバイオアベイラビリティを示し、しかも安定な製剤であることが確認された。従って薬剤としても、注射剤、点眼剤、点鼻剤、吸入剤、経皮吸収剤、局所注射剤などで代表される広範な形態を

20 25

1 採り得る。また、トリシクロ化合物（I）を移行させること
が特に望まれる部位への集中的な移行性を高めたり、逆に移
行させることが必ずしも望ましくない部位への移行を抑制す
ることも可能となる。その結果、薬効の増強、副作用の軽
減、薬効の持続性などの実用上優れた効果が得られる。
5

本発明の製剤は、トリシクロ化合物（I）が優れた免疫抑
制作用および抗菌作用等の薬理作用を有し、従って、心臓、
腎臓、肝臓、骨髓、皮膚、角膜、肺、脾臓、小腸、手足、筋
肉、神経、椎間板、気管等の臓器または組織の移植の際の拒
10 絶反応；骨髓移植による移植片対宿主反応；慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、橋本甲状腺炎、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病等の自己免疫疾患；並びに病原性微生物による感染症の治療及び予防に有用である。

さらにトリシクロ化合物（I）の製剤は、次の疾患の治療
15 及び予防にも有用である。炎症性及び増殖亢進性皮膚病及び
免疫学的仲介皮膚疾患（例えば、乾癬、アトピー性皮膚炎、接
触性皮膚炎、湿疹状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、扁平苔癬、天
疱瘡、水疱瘡類天疱瘡、表皮水疱症、尋麻疹、血管性水腫、
脈管炎、紅斑、皮膚好酸球増加症、紅斑性狼瘡、座瘡及び円
20 形脱毛症）；

自己免疫疾患の眼疾患（例えば、角結膜炎、春季結膜炎、ベ
ーチェット病関連のブドウ膜炎、角膜炎、ヘルペス性角膜
炎、円錐形角膜炎、角膜上皮異常症、角膜白斑、眼天疱
瘡、モーア潰瘍、強膜炎、グレーブス眼障害、フォークトー
25 小柳－原田症候群、類肉腫症等）；

- 1 可逆的閉塞性気道疾患、〔ぜん息（例えば、気管支ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、外因性ぜん息及び塵埃性ぜん息）、特に慢性または難治性ぜん息（例えば、遅発型ぜん息及び気道反応性亢進）、及び気管支炎等〕；
- 5 粘膜及び血管の炎症（例えば胃潰瘍、虚血症及び血栓症による血管損傷、虚血性腸疾患、腸炎、壞死性全腸炎、火傷による腸損傷、ロイコトリエンB₄－仲介疾患；腸の炎症／アレルギー（例えば、小児脂肪便症、直腸炎、好酸性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病及び潰瘍性大腸炎）；
- 10 胃腸管から遠隔の部位に症候性症状発現をする食物関連アレルギー疾患（例えば偏頭痛、鼻炎及び湿疹）；腎症（例えば、間質性腎炎、グッドパスチャ－症候群、溶血性尿毒症症候群及び糖尿病性腎症）；神経性疾患（例えば多発性筋炎、ギラン－バレー症候群、メニエール病及び神經根障害）；
- 15 内分泌疾患（例えば、甲状腺機能亢進症及びバセドウ病）；血液疾患（例えば、純赤芽球病、再生不良性貧血、形成不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、無顆粒球症、悪性貧血、巨赤芽球性貧血及び赤血球形成不全症）；
- 20 骨疾患（例えば、骨粗鬆症）；呼吸器系統疾患（例えば、サルコーヴィドシス（類肉腫症）、肺纖維症及び特発性間質性肺炎）；皮膚疾患（例えば、皮膚筋炎、尋常性白斑症、尋常性魚鱗癖、光線過敏症及び皮膚T細胞リンパ腫）；循環器系統疾患（例えば、動脈硬化症、ア

- 1 テローム硬化症、大動脈炎症候群、結節性多発性動脈炎及び心筋症) ; 膠原病(例えば、強皮症、ウェゲナー肉芽腫及びシェーブレン症候群) ;
脂肪過多症 ;
- 5 好酸球性筋膜炎 ;
歯周病 [例えば、歯肉、歯周、歯槽骨、(歯の)セメント質の損傷] ;
ネフローゼ症候群(例えば、系球体腎炎) ;
男性型脱毛症または老人性脱毛症 ;
- 10 筋ジストロフィー ;
膿皮症及びセザリー症候群 ;
アジソン病 ;
活性酸素仲介疾患 [例えば、臓器損傷(保存、移植または虚血性疾患(血栓症、心筋梗塞)の際に生ずる(心臓、肝臓、
- 15 腎臓、消化管等の)臓器の虚血性血流損傷) : 腸疾患(例えばエンドトキシンショック、偽膜性大腸炎、薬剤または放射線による大腸炎) : 腎性疾患(例えば虚血性急性腎不全、慢性腎不全) : 肺疾患(例えば肺中酸素または薬剤(例えばバラコート、プレオマイシン)による中毒、肺癌、肺気腫) :
20 眼病(例えば白内障、鉄沈着症(眼球鉄鏽症)、網膜炎、色素沈着症、老人性斑点変質、ガラス体瘢痕、アルカリ火傷角膜) : 皮膚炎(例えば、多形性紅斑、綿状免疫グロブリンA皮膚炎、セメント皮膚炎) : 及びその他の疾患(例えば歯肉炎、歯周炎、敗血症、肺炎、又は環境汚染(例、大気汚染)
25 、老化、発癌物質、癌転移、高山病による疾患)] ;

1 ヒスタミンまたはロイコトイリエン C₄ 遊離による疾患等。

さらに、トリシクロ化合物（I）の製剤は、肝臓再生作用及び／または肝細胞の肥大及び過形成の刺激作用を有する。

従って、それら化合物は、肝疾患 [例、免疫原性疾患（自己

5 免疫性肝臓病、原発性胆汁性肝硬変または硬化性胆管炎のような慢性自己免疫性肝臓病）、部分的肝臓切除、急性肝臓壞死（例えば、毒物、ウィルス性肝炎、ショックまたは無酸素症による壞死）、B型肝炎、非A非B型肝炎、肝硬変及び肝機能不全（例、劇症肝炎、遅発性肝炎及び急性から慢性へ移行した肝機能不全）] の治療及び予防に有用である。

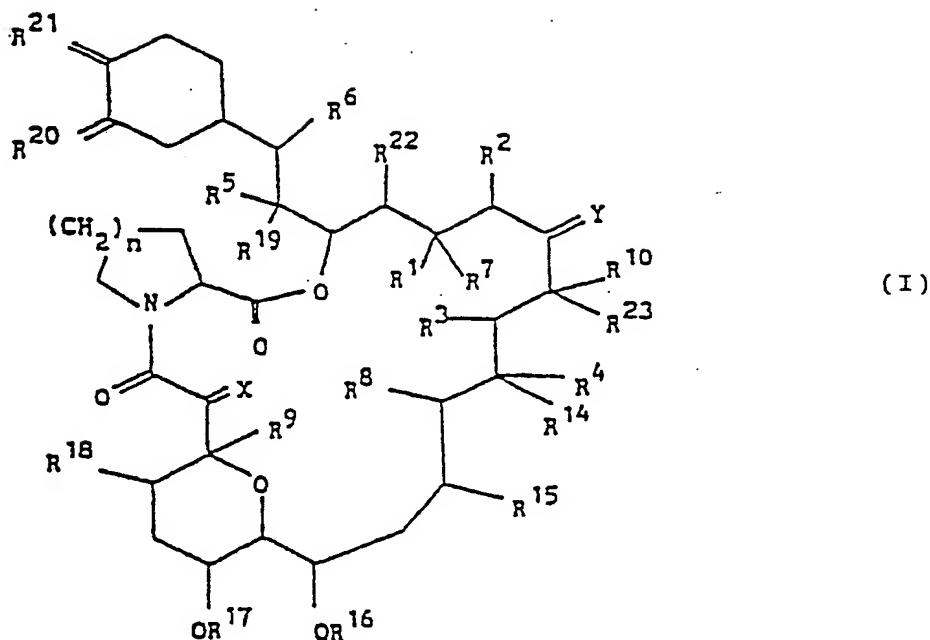
さらにまたトリシクロ化合物（I）の製剤は、化学療法作用の増強作用、サイトメガロウィルス感染の予防及び治療作用、抗炎症作用等のような薬理作用により種々の疾患に有用である。

1

請求の範囲

1. 一般式(I)

5



10

15

(式中、R¹ および R²、R³ および R⁴、R⁵ および R⁶ の隣接するそれぞれの対は、各々独立して、

- a) 2つの隣接する水素原子を表わすか、もしくは
- 20 b) 結合している炭素原子との間でもうひとつの結合を形成してもよく、

それに加え、R² はアルキル基であってもよく、
 R⁷ は水素原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、
 もしくはアルキルオキシ基を表わすか、または R¹ と共に
 25 なってオキソ基を表わしていてもよく、

1 R⁸ および R⁹ は独立して、水素原子、ヒドロキシ基を、
R¹⁰ は水素原子、アルキル基、1 以上のヒドロキシ基によつ
て置換されたアルキル基、アルケニル基、1 以上のヒドロ
キシ基によって置換されたアルケニル基、またはオキソ基
5 によって置換されたアルキル基を、
X はオキソ基、(水素原子、ヒドロキシ基)、(水素原子、
水素原子)、または式 - C H₂ - O - で表わされる基を、
Y はオキソ基、(水素原子、ヒドロキシ基)、(水素原子、
水素原子)、または式 = N - N' R¹¹ R¹² もしくは = N - O
10 R¹³ で表わされる基を、
R¹¹ および R¹² は独立して水素原子、アルキル基、アリール
基またはトシリル基を、
R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶、R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹、R²² および
R²³ は独立して水素原子またはアルキル基を、
15 R²⁰ および R²¹ は、独立してオキソ基、または各々独立して
(R²⁰a、水素原子) および (R²¹a、水素原子) であつ
てもよく、R²⁰a および R²¹a は独立してヒドロキシ基、
アルキルオキシ基、もしくは、式 - O C H₂ - O C H₂
C H₂ - O C H₃ で表わされる基、または R²¹a は保護され
20 たヒドロキシ基を表わし、さらに R²⁰a および R²¹a は共
になってエポキシド環中の酸素原子を表わしていてもよ
く、
n は 1、2 または 3 を表わす。
上記の意味に加え、さらに Y、R¹⁰ および R²³ はそれらが
25 結合している炭素原子と一緒にになって飽和もしくは不飽和の

1 5員もしくは6員環からなる窒素原子、硫黄原子および／もしくは酸素原子を含有する複素環基を表わしていてもよいが、その複素環基は、アルキル基、ヒドロキシ基、1以上のヒドロキシ基によって置換されたアルキル基、アルキルオキシ基、ベンジル基および式- $\text{CH}_2\text{Se}(\text{C}_6\text{H}_5)$ で表わされる基から選ばれる1以上の基によって置換されていてもよい)

5 で示されるトリシクロ化合物または医薬として許容されるその塩を、リポソーム中に含有させたものであることを特徴とするトリシクロ化合物含有リポソーム製剤。

10 2. トリシクロ化合物(I)が、

R^3 および R^4 、 R^5 および R^6 の隣接するそれぞれの対が、それらが結合する炭素原子との間に形成されたもう一つの結合を形成してもよく、

15 R^8 と R^{23} は独立して水素原子、

R^9 はヒドロキシ基、

R^{10} はメチル、エチル、プロピル又はアリル基、

Xは(水素原子、水素原子)、またはXはオキソ基、

Yはオキソ基、

20 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} と R^{22} はそれぞれメチル基、

R^{20} と R^{21} は独立して、(R^{20}a 、水素原子)または(R^{21}a 、水素原子)、(但し R^{20}a と R^{21}a はそれぞれヒドロキシ基またはアルコキシ基、または R^{21}a は保護されたヒドロ

25 キシ基)、

1 nは1または2

である化合物である請求項1に記載のリボソーム製剤。

3. トリシクロ化合物(I)が、R⁷が水素原子、ヒドロキシ基または保護されたヒドロキシ基、Xがオキソ基、R²⁰
5 aがメトキシ基、R²¹aがヒドロキシ基又は保護されたヒドロキシ基である請求項1または2に記載のリボソーム製剤。

4. トリシクロ化合物(I)が 17-アリル-1,14-ジヒドロ
キシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-
メチルビニル]-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27- テトラメチ
10 ル-11,28- ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オク
タコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオンまたは 17-エチル-
1,14- ジヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシク
ロヘキシル)-1-メチルビニル]-23,25-ジメトキシ-13,19,21,
27- テトラメチル-11,28- ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.
15 3.1.0.4,9]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオンであ
る請求項1～3のいずれかに記載のリボソーム製剤。

5. リボソームを形成する脂質として、その親水性基部分
が中性電荷を有するリン脂質を主成分として使用するもので
ある請求項1～4のいずれかに記載のリボソーム製剤。

20 6. リボソームを形成する脂質として、その親水性基部分
が負電荷を有するリン脂質を主成分として使用するもので
ある請求項1～4のいずれかに記載のリボソーム製剤。

7. リボソームを形成する脂質として、その親水性基部分
が中性電荷を有するリン脂質と、その親水性基部分が負電荷
25 を有するリン脂質を併用したものである請求項1～4のいず

27

1 れかに記載のリポソーム製剤。

8. リポソームが、リン脂質とコレステロールを含んで構成されたものである請求項1～7のいずれかに記載のリポソーム製剤。

5

10

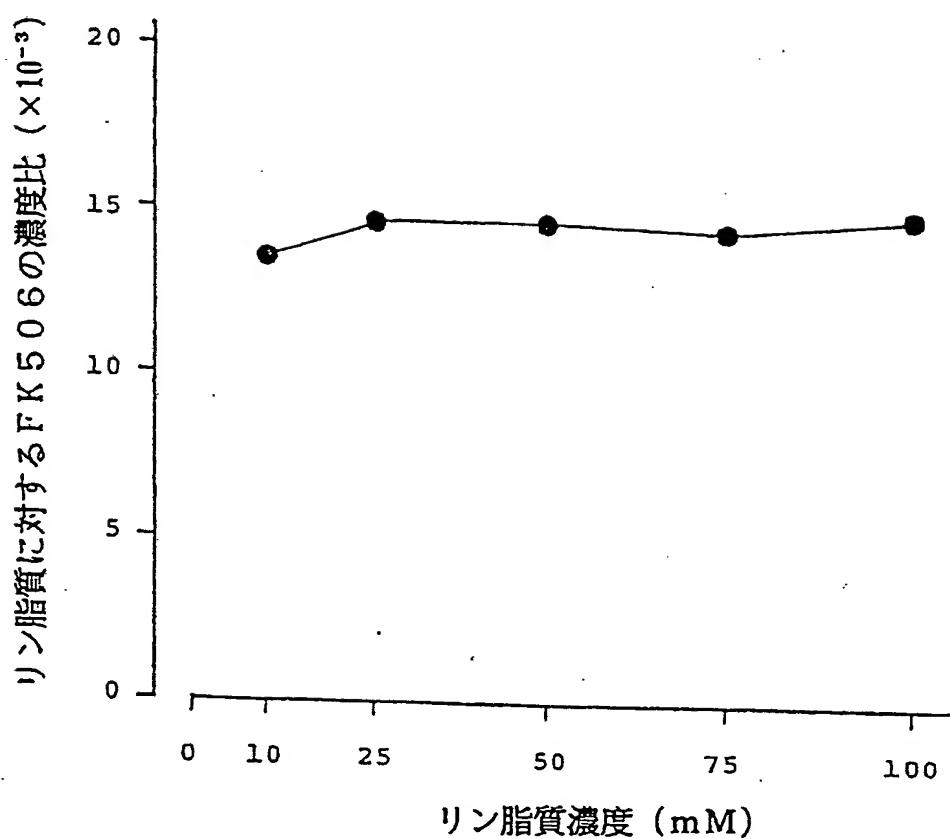
15

20

25

1/1

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP92/01388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A61K31/40, A61K31/445, A61K31/55, A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A61K31/40, A61K31/445, A61K31/55, A61K9/127

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, A, 61-148181 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), July 5, 1986 (05. 07. 86), Claim and upper column, page 30 & EP, A, 184162 & US, A, 4929611	1-8
Y	JP, A, 2-167217 (Shiseido Co., Ltd.), June 27, 1990 (27. 06. 90), Claim (Family: none)	1-8
Y	JP, A, 61-37729 (The Ribosome Co., Inc.), February 22, 1986 (22. 02. 86), Claim & EP, B, 153364 & US, A, 5000958	1-8
Y	JP, A, 3-128320 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), May 31, 1991 (31. 05. 91), Claim and upper column, page 4 (Family: none)	1-8

<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/>	See patent family annex.
"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search January 13, 1993 (13. 01. 93)	Date of mailing of the international search report February 2, 1993 (02. 02. 93)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 92/01388

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int. CL⁴
A 61K 31/40, A 61K 31/445, A 61K 31/55, A 61K 9/127

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC)) Int. CL⁴**A 61K 31/40, A 61K 31/445, A 61K 31/55, A 61K 9/127**

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 61-148181(藤沢薬品工業株式会社), 5. 7月. 1986(05. 07. 86) クレーム及び第30頁上欄 & EP, A, 184162 & US, A, 4929611	1-8
Y	JP, A, 2-167217(株式会社 賽生堂), 27. 6月. 1990(27. 06. 90) クレーム(ファミリーなし)	1-8

 C欄の続きを参照する。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 01. 93

国際調査報告の発送日

02.02.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

佐 伯 とも子

4 C 7 2 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 92/01388

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 61-37729 (ザ リボソーム カンパニー, インコ ーポレーテッド) 22. 2月. 1986 (22. 02. 86) クレーム&EP, B, 153364 & US, A, 5000958	1-8
Y	JP, A, 3-128320 (藤沢薬品工業株式会社), 31. 5月. 1991 (31. 05. 91) クレーム及び第4頁上欄(ファミリーなし)	1-8